

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平11-501518

(43)公表日 平成11年(1999) 2月9日

(51)Int.Cl. ⁶		識別記号	F I
C 1 2 N	15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00 Z N A A
A 6 1 K	35/76		A 6 1 K 35/76
	38/00	A B N	48/00 A B X
	48/00	A B X	C 1 2 N 7/00
C 1 2 N	7/00		A 6 1 K 37/02 A B N
			審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 36 頁)
(21)出願番号		特願平8-527333	(71)出願人 ローヌーブーラン・ロレ・エス・アー
(86) (22)出願日		平成 8 年(1996) 3 月12日	フランス国、エフー92160・アントニー、
(85)翻訳文提出日		平成 9 年(1997) 9 月12日	アブニユ・レイモン・アロン、20
(86)国際出願番号		P C T / F R 9 6 / 0 0 3 8 1	(72)発明者 ドウネフル、バトリス
(87)国際公開番号		W O 9 6 / 2 8 5 5 3	フランス国、エフー94100・サン・モール、
(87)国際公開日		平成 8 年(1996) 9 月19日	アブニユ・デ・フュジエードウ・シャトー
(31)優先権主張番号		9 5 / 0 2 9 4 3	ブリアン、45
(32)優先日		1995年 3 月14日	(72)発明者 デュベルジェ、ニコラ
(33)優先権主張国		フランス (F R)	フランス国、エフー75010・パリ、リュ・
			マルテル、1
			(74)代理人 弁理士 川口 義雄 (外 2 名)
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 レシチン-コレステロールアシルトランスフェラーゼを発現する組換えウイルス及び遺伝子治療におけるその使用

(57)【要約】

本発明は、レシチン-コレステロールアシルトランスフェラーゼ (L C A T) 又はその変異体の全部又は一部をコードする少なくとも 1 種の挿入遺伝子を含む欠損組換えウイルス、これらのウイルスを含む医薬組成物、及びリポタンパク異常血症に関連する疾病の治療又は予防のためのその使用に関する。

【特許請求の範囲】

1. レシチン-コレステロールアシルトランスフェラーゼ（LCAT）又はその変異体の全部又は一部をコードする少なくとも1種の挿入遺伝子を含む欠損組換えウイルス。
2. 感染細胞におけるその複製に必要なそのゲノムの領域を欠失していることを特徴とする請求項1に記載のウイルス。
3. 好ましくはAd5又はAd2型のアデノウイルスであることを特徴とする請求項1又は2に記載のウイルス。
4. 動物、好ましくはイヌ起源のアデノウイルスであることを特徴とする請求項1又は2に記載のウイルス。
5. 挿入遺伝子がヒトLCAT又はその変異体の全部又は一部をコードすることを特徴とする請求項1から4のいずれか一項に記載のウイルス。
6. 挿入遺伝子がヒトLCATをコードすることを特徴とする請求項5に記載のウイルス。
7. 挿入遺伝子がcDNAであることを特徴とする請求項1から6のいずれか一項に記載のウイルス。
8. 挿入遺伝子がgDNAであることを特徴とする請求項1から6のいずれか一項に記載のウイルス。
9. 挿入遺伝子が感染細胞におけるその発現を可能にする配列を含むことを特徴とする請求項1から8のいずれか一項に記載のウイルス。
10. 挿入遺伝子が標的細胞の分泌経路に合成ポリペプチドを誘導するシグナル配列を含むことを特徴とする請求項1から9のいずれか一項に記載のウイルス。
11. E1領域の全部又は一部の欠失を含むことを特徴とする請求項3又は4に記載のアデノウイルス。
12. 更にE4領域の全部又は一部の欠失を含むことを特徴とする請求項11に記載のアデノウイルス。
13. アデノ随伴ウイルス（AAV）であることを特徴とする請求項1又は2に記載のウイルス。

14. そのゲノムが2個のITRに挟まれたレシチン-コレステロールアシルトランスフェラーゼ(LCAT)又はその変異体の全部又は一部をコードする遺伝子を含むことを特徴とする請求項13に記載のウイルス。

15. レトロウイルスであることを特徴とする請求項1又は2に記載のウイルス。

16. リポタンパク異常血症に関連する疾病の治療又は予防用医薬組成物の製造のための、請求項1から15のいずれか一項に記載のウイルスの使用。

17. アテローム性動脈硬化症及び/又は再発狭窄症の治療用医薬組成物の製造のための請求項16に記載の使用。

18. 請求項1から15のいずれか一項に記載の1種以上の欠損組換えウイルスを含む医薬組成物。

19. 注射可能な形態であり、 $10^4 \sim 10^{14}$ pfu/mlのアデノウイルスを含むことを特徴とする請求項18に記載の医薬組成物。

20. アポリポタンパク質をコードする1種以上の欠損組換えアデノウイルスを更に含むことを特徴とする請求項19に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

レシチン-コレステロールアシルトランスフェラーゼを発現する組換えウイルス及び遺伝子治療におけるその使用

本発明は新規組換えウイルス、その製造及び遺伝子治療において所望の遺伝子をインビボ導入発現させるためのその使用に関する。より詳細には、本発明はレシチン-コレステロールアシルトランスフェラーゼ（LCAT）又はその変異体の全部又は一部をコードする挿入遺伝子を含む新規組換えウイルスに関する。本発明は更に、前記組換えウイルスを含む医薬組成物にも関する。より詳細には、本発明は欠損組換えウイルスと、心臓血管及び神経レベルに重大な影響を及ぼすとして知られているリポタンパク異常血症に関連する疾病の予防又は治療のためのその使用に関する。

リポタンパク異常血症は、コレステロールやトリグリセリド等の脂質を血液及び末梢体液に輸送するのに関与するリポタンパク質の代謝不全である。リポタンパク異常血症は、特にアテローム性動脈硬化症等の高コレステロール血症又は高トリグリセリド血症に夫々結びつけられる重大な疾病を誘発する。アテローム性動脈硬化症は、組織学的には大及び中動脈（大動脈、

冠動脈、頸動脈）の壁における脂質及び他の血液誘導体の沈着（脂質又は繊維脂質斑）として定義される多元性合併症である。これらの斑は進度に応じて多少なりとも石灰化しており、病変に相関していると考えられ、主にコレステロールエステルから構成される脂肪沈着の動脈蓄積に結び付けられる。これらの斑は動脈壁の肥厚をもたらし、平滑筋の肥厚、泡沫細胞の出現及び繊維組織の蓄積を伴う。アテローム斑は壁から非常に著しく突出しているので狭窄性をもち、重度患者に突発するアテローム、血栓症又は血栓症による血管閉塞の原因となる。このため、コレステロール過剰血症は梗塞、突然死、心臓代償不全、脳血管発作等の非常に重度の心臓血管病を誘発し得る。

従って、所定の疾病状態で血漿コレステロール濃度を低下させ、更には末梢組織のレベルでコレステロールの流出（コレステロールの逆輸送）を刺激し、アテローム斑の形成に関連して細胞に蓄積したコレステロールを除去することが可能

な治療を実施できることが、特に重要である。コレステロールは血液中で低密度リポタンパク質（LDL）と高密度リポタンパク質（HDL）を含む種々のリポタンパク質により運搬される。LDLは肝レベルで合成され、末梢組織にコレステロールを供給する

ことができる。他方、HDLは末梢組織のレベルでコレステロールを捕獲し、肝臓に運搬して貯蔵及び／又は分解させる。

現在、脂血症、特に高コレステロール血症は、コレステロールの生合成（ヒドロキシメチルグルタリル補酵素Aレダクターゼの阻害剤、スタチン）、胆汁コレステロールの捕獲及び除去（キレート剤又は樹脂）、又は分子面でまだ解明されていない作用モードによる脂肪分解（フィブレート）に作用する化合物を用いて主に治療されている。従って、この適応症で使用されている広い分類の全医薬（キレート剤、フィブレート又はスタチン）は、アテローム斑の形成の予防のみに向けられており、実際にアテロームの治療は目的としていない。冠動脈発作後のアテロームの現在の治療はコレステロールのホメオスタシスに介入するのではなく、外科処置（冠動脈バイパス、血管形成術）であるため、対症療法に過ぎない。

遺伝子治療によるこれらの疾病の治療の最初のアプローチは国際出願公開第WO 94/25073号に記載されている。このアプローチは特に、アポリポタンパク質をコードする遺伝子の直接導入に関する。本発明はリポタンパク異常血症に関連する疾病の治療のための新規治療アプローチである。本発明はよ

り詳細には、コレステロールの異化作用に関与する酵素をコードする遺伝子の導入に関する。特に、本発明によるLCATのインビボ導入及び発現は、循環HDL率のみならず、コレステロールの逆輸送に結び付けられるその酵素活性にも働きかけることができるという利点がある。従って、本発明のアプローチはコレステロールを肝臓に戻すことを目的とする二重の刺激効果がある。本発明は更に、コレステロールの代謝酵素をコードする遺伝子を肝レベルで導入発現させ、循環系で前記酵素を分泌させ、高い効率でその活性を発揮させることが可能なウイル

スの使用に関する。後述する実施例では特に、アデノウイルスがレシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ（LCAT）をコードする遺伝子を投与方法に応じて細胞毒性作用なしに長期間有効に導入発現できることを示す。

従って、本発明の第1の目的は、レシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ（LCAT）及びその変異体の全部又は一部をコードする少なくとも1種の挿入遺伝子を含む欠損組換えウイルスにある。

本発明の別の目的は、リポタンパク異常血症に関連する疾病の治療又は予防用医薬組成物の製造のための、前記欠損組換え

ウイルスの使用である。

ヒトレシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ（LCAT）は65～69 kDの相対分子量をもつ416アミノ酸の糖タンパク質である。LCATをコードする遺伝子及びcDNAは夫々4200及び1744bpの長さであり、クローニング及び配列決定されている（McLeanら, Proc. Natl. Acad. Sci. 83 (1986) 2335及びMcLeanら, Nucleic Acids Res. 14 (23) (1986) 9397）。LCATはコレステロールのヒドロキシル残基にホスファチジルコリンのアシル基を転移して遊離コレステロールのエステル化を触媒し、コレステロールのエステルとトリホスファチジルコリンを形成する酵素である。LCATはヒトでは肝臓で特異的に合成され、血漿中に遊離され（ $6\mu\text{g}/\text{ml}$ ）、抗アテローム原性リポタンパク質である高密度リポタンパク質（HDL）と結合する。これらの粒子は細胞中に過剰に存在するコレステロールを受容することができ、その後、LCATによりエステル化される。コレステロールエステル濃度の高いHDLは肝臓で捕獲された後、排出される。生物から過剰のコレステロールを排出できるこのメカニ

ズムはコレステロールの逆輸送と呼ばれ、アテローム原性の予防に明らかに関係がある（Ana Jonas BBA 1084 (1991) 273及びJohnsonら, BBA 1085 (1991) 205）。LCATは細胞膜と循環リポタンパク質の間に遊離コレステロール勾配を生じることにより、このプロセ

スで重要な役割を果たすとは確信される。

血漿中のL C A T酵素の活性の部分的又は完全な不在による生理的影響は、「魚眼」症候群（フィッシュアイ病、F E S）や一般L C A T欠損症に見られる病変として現れる。F E Sの臨床症状は不透明角膜と腎障害及び貧血である。後者2つの症状は低 α リポタンパク血症と血漿トリグリセリド濃度の上昇に結び付けられる。これらの症状は血漿中のL C A T活性の生化学的定量によっても検出できる。一般L C A T欠損症患者ではコレステロールの血漿エステル化活性は検出できないが、F E S特徴をもつ患者ではL C A T残留活性が観察される。本発明によるL C A T遺伝子の導入は、心臓血管病の治療のための新規アプローチとなる。本発明によると、この遺伝子をインビボ導入し、L C A Tを過剰発現させることができるため、循環H D L率の増加とこれらのH D Lの酵素活性の増加という両面で、

コレステロール流出に二重の刺激活性作用を発揮することができる。

本発明のウイルスでは、挿入遺伝子は相補的D N A（c D N A）、ゲノムD N A（g D N A）フラグメントでもよいし、例えばc D N Aに1個以上のイントロンを挿入するなどしたハイブリッド構築物でもよい。遺伝子は合成配列でも半合成配列でもよい。上述のように、遺伝子はL C A T又はその変異体の全部又は一部をコードする遺伝子であり得る。本発明によると、変異体なる用語はL C A Tの少なくとも1種の生物学的性質をもつ任意の突然変異体、フラグメント又はベプチドと、L C A Tの全天然変異体を意味する。これらのフラグメント及び変異体は当業者に公知の任意の技術により得られ、特に遺伝子及び／又は化学的及び／又は酵素修飾、又はその生物活性に応じて変異体の選択が可能な発現によるクローニングを利用できる。遺伝子修飾としては、抑圧、欠失、突然変異等が挙げられる。

本発明における挿入遺伝子は、ヒトL C A Tの全部又は一部をコードする遺伝子が好ましい。c D N A又はg D N Aがより好ましい。

一般に、挿入遺伝子は感染細胞におけるその発現を可能にす

る配列も含む。このような配列は、該配列が感染細胞で機能し得るときに挿入遺伝子の発現に天然に関与する配列であり得る。(他のタンパク質又は合成タンパク質の発現に関与する)別の起源の配列でもよい。特に、遺伝子の転写を特異的又は非特異的に誘導的又は非誘導的に刺激又は抑制する真核もしくはウイルス遺伝子の配列又は誘導配列が挙げられる。例えば、感染させたい細胞のゲノム、又はウイルスのゲノムに由来するプロモーター配列、特にアデノウイルスのE1A、MLP遺伝子のプロモーター、CMV、LTR-RSVプロモーター等を挙げることができる。真核プロモーターとしては、ユビキチンプロモーター(HPR、ビメンチン、 α -アクチン、チューブリン等)、中間フィラメント(デスミン、ニューロフィラメント、ケラチン、GFAP等)のプロモーター、治療遺伝子プロモーター(MDR、CFTR、VIII因子型等)、組織特異的プロモーター(ビルビン酸キナーゼ、ビリン、脂肪酸結合タンパク質のプロモーター、平滑筋細胞の α アクチンプロモーター、肝特異的プロモーター、アポA I、アポA II、ヒトアルブミン等)又は刺激応答プロモーター(ステロイドホルモンレセプター、レチノイン酸レセプター等)を挙げることができる。更

に、活性化配列、調節配列等を加えてこれらの発現配列を修飾してもよい。また、挿入遺伝子が発現配列を含まない場合には、このような配列の下流で欠損ウイルスのゲノムに挿入してもよい。

更に、挿入遺伝子は一般に標的細胞の分泌経路に合成ポリペプチドを誘導するシグナル配列をコーディング配列の上流に含む。このシグナル配列はLCATの天然シグナル配列でもよいし、他の任意の機能シグナル配列又は人工シグナル配列でもよい。

本発明によるウイルスは欠損ウイルスであり、即ち標的細胞で自律的に複製できないウイルスである。従って、一般に本発明の範囲で使用される欠損ウイルスのゲノムは感染細胞で少なくとも該ウイルスの複製に必要な配列を欠失している。これらの領域は(完全又は部分的に)除去してもよいし、非機能的にしてもよいし、他の配列、特に挿入遺伝子で置換してもよい。他方、欠損ウイルスはウイルス粒子のパッケージングに必要なそのゲノムの配列を保存することが好ましい

。

本発明によるウイルスはアデノウイルス、アデノ随伴ウイルス(AAV)又はレトロウイルスに由来し得る。好適態様によ

ると、ウイルスはアデノウイルスである。

構造と性質が多少異なる種々の血清型のアデノウイルスが存在する。これらの血清型のうちでは、本発明の範囲では2もしくは5型のヒトアデノウイルス(Ad2又はAd5)又は動物起源のアデノウイルス(国際公開第WO94/26914号参照)を使用するのが好ましい。本発明の範囲で使用可能な動物起源のアデノウイルスのうちでは、イヌ、ウシ、マウス(例えばMav1, Beardら, *Virology*, 75(1990)81)、ヒツジ、ブタ、トリ又はサル(例えばSAV)起源のアデノウイルスを挙げることができる。好ましくは動物起源のアデノウイルスはイヌアデノウイルス、より好ましくはアデノウイルスCAV2[例えばマンハッタン株又はA26/61(ATCC VR-800)]である。本発明の範囲ではヒトもしくはイヌ由来のアデノウイルス又は混合アデノウイルスを使用するのが好ましい。

好ましくは、本発明の欠損アデノウイルスはITRと、パッケージングを可能にする配列と、有用核酸を含む。より好ましくは、本発明のアデノウイルスのゲノムにおいて少なくともE1領域は非機能的である。着目ウイルス遺伝子は当業者に公知

の任意の技術、特に完全抑圧、置換、部分欠失、又は着目遺伝子への1個以上の塩基の付加により非機能的にすることができる。このような改変は例えば遺伝子工学技術又は突然変異誘発物質で処理することにより、(単離したDNAで)インビトロ又は*in situ*で得られる。特にE3(WO95/02697)、E2(WO94/28938)、E4(WO94/28152、WO94/12649、WO95/02697)及びL5(WO95/02697)等の他の領域も改変できる。好適態様によると、本発明によるアデノウイルスはE1及びE4領域に欠失を含む。別の好適態様によると、前記アデノウイルスはE1領域に

欠失を含み、このレベルにE4領域とLCATをコードする配列を挿入する（仏国特許出願第FR94 13355号参照）。

本発明による欠損組換えアデノウイルスは、当業者に公知の任意の技術により作製することができる（Levreroら, Gene 101 (1991) 195, EP185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917）。特に、アデノウイルスと特に有用DNA配列をもつプラスミドの相同組換えにより作製することができる。相同組換えは前記ア

デノウイルスとプラスミドを適当な細胞系に同時トランスフェクション後に生じる。使用する細胞系は、(i) 前記要素により形質転換可能であり、(ii) 好ましくは組換えの危険を避けるように組み込み形態で欠損アデノウイルスのゲノムの部分を相補することが可能な配列を含んでいることが好ましい。細胞系の例としては、特にアデノウイルスAd5のゲノムの左側部分（12%）をそのゲノムに組込んだ293ヒト胎児腎細胞系（Grahamら, J. Gen. Virol. 36 (1977) 59）や、特に国際公開第W094/26914号及びW095/02697号に記載されているようなE1及びE4機能を相補することが可能な系を挙げることができる。

その後、増殖したアデノウイルスを実施例に記載するような慣用分子生物学技術により回収精製する。

アデノ随伴ウイルス(AAV)は、感染細胞のゲノムに安定且つ部位特異的に組み込まれる比較的小寸法のDNAウイルスである。アデノ随伴ウイルスは細胞増殖、形態又は分化に影響することなく広範な細胞に感染することができる。また、ヒトの病理に関与しないと思われる。AAVのゲノムは既にクローニングされ、配列及び特性を決定されている。このようなゲノ

ムは約4700塩基を含み、各末端にウイルス複製起点として機能する約145塩基の逆方向反復領域(ITR)を含む。ゲノムの残余はパッケージング機能をもつ2つの主領域に分けられ、ゲノムの左側はウイルス複製とウイルス遺伝子の発現に関与するrep遺伝子を含み、ゲノムの右側はウイルスのキャプシドタン

バク質をコードするcap遺伝子を含む。

AAVに由来するベクターを遺伝子のインビトロ及びインビボ導入に使用することは文献に記載されている（特に国際出願公開第W091/18088号、同W093/09239号、米国特許第4,797,368号、同第5,139,941号、ヨーロッパ特許第488528号参照）。これらの特許出願はAAVに由来し、rep及び/又はcap遺伝子を欠失し、有用遺伝子で置換した種々の構築物と、前記有用遺伝子を（培養細胞に）インビトロ又は（生物に直接）インビボ導入するための前記構築物の使用について記載している。本発明による欠組換えAAVは、AAVの2つの逆方向反復領域（ITR）に挟まれた有用核酸配列を含むプラスミドと、AAVのパッケージング遺伝子（rep及びcap遺伝子）をもつプラスミドとをヒト補助ウイルス（例えばアデノウイルス）に感染させた細

胞系に同時トランスフェクトすることにより作製できる。生成した組換えAAVをその後、慣用技術により精製する。従って、本発明はAAVから誘導される組換えウイルスであって、そのゲノムがAAVのITRに挟まれたLCATをコードする配列を含む組換えウイルスにも関する。本発明は更に、AAVの2つのITRに挟まれたLCATをコードする配列を含むプラスミドにも関する。このようなプラスミドは、場合によりボソームベクター（ブソイドウイルス）に組み込み、LCATの配列を導入するためにそのまま使用できる。

レトロウイルスについては、組換えベクターの構築が文献に広く記載されており、特にヨーロッパ特許第453242号及び同178220号；Bernsteins, Genet. Eng. 7 (1985) 235；McCormick, BioTechnology 3 (1985) 689等を参照されたい。特に、レトロウイルスは分裂中の細胞に感染する組込みウイルスである。レトロウイルスのゲノムは主に2つのLTRと、1つのパッケージング配列と、3つのコーディング領域（gag、pol及びenv）を含む。レトロウイルスに由来する組換えベクターでは、gag、pol及びenv遺

伝子は一般に全部又は一部が欠失しており、有用異種核酸配列で置換されている。これらのベクターは特にMoMuLV(「モロニーマウス白血病ウイルス」、MoMLVとも呼ぶ)、MSV(「モロニーマウス肉腫ウイルス」、HaSV(「ハーバー肉腫ウイルス」、SNV(「脾臓壊死ウイルス」、RSV(「ラウス肉腫ウイルス」)又はフレンドウイルス等の種々のレトロウイルスから作製することができる。

本発明によるLCATをコードする配列を含む組換えレトロウイルスを構築するためには、一般には特にLTRとパッケージング配列と前記コーディング配列を含むプラスミドを構築した後、プラスミドに欠損レトロウイルス機能をトランス付加することが可能な所謂パッケージング細胞系にトランスフェクトするために使用する。従って、パッケージング系は一般にgag、pol及びenv遺伝子を発現することが可能である。このようなパッケージング系は従来技術に記載されており、特にPA317系(米国特許第4,861,719号)、PsiC RIP系(WO90/02806号)及びGP+envAm-12系(WO89/07150号)が挙げられる。更に、組換えレトロウイルスはLTRのレベルに転写活性を抑制するため

の修飾を含んでいてもよく、gag遺伝子の一部を含む延長パッケージング配列を含んでもよい(Benderら、J. Virol. 61 (1987) 1639)。生成した組換えレトロウイルスをその後、慣用技術により精製する。

本発明は、1種以上の上記のような欠損組換えウイルスを含む医薬組成物にも関する。このような組成物は局所、経口、非経口、鼻腔内、静脈内、筋肉内、皮下、眼内等の経路で投与するように調合することができる。

好ましくは、本発明による組成物は注射用調合物に医薬的に許容可能なキャリアーを含有する。キャリアーとしては、特に滅菌等張塩類溶液(一塩基リン酸塩、二塩基リン酸塩、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム等、又はこれらの塩類の混合物)、又は場合に応じて滅菌水もしくは生理的血清を加えると注射可能な溶質を構成できる乾燥組成物、特に凍結乾燥組成物が挙げられる。

リポタンパク異常血症に関連する疾病の治療に使用するには、本発明による欠損組換えアデノウイルスは種々の方法、特に静脈注射により投与できる。門脈のレベルに注射するのが好ましい。レトロウイルスについては、場合により新臓器(WO94

／24298)としてインビボ再移植する目的で感染細胞をエキスポ利用できるという利点がある。

注射に使用するウイルスの用量は種々のパラメーター、特に使用する投与方法、該当疾病、又は所望の治療期間に応じて適応できる。一般に、本発明による組換えウイルスは $10^4 \sim 10^{14}$ p f u / m l の用量で調合及び投与される。AAV及びアデノウイルスでは、 $10^6 \sim 10^{10}$ p f u / m l の用量も使用できる。p f u (「プラーク形成単位」)なる用語はビリオン懸濁液の感染能に対応し、適当な細胞培養物の感染により測定され、一般に48時間後の感染細胞のプラーク数を表す。ウイルス溶液のp f u 力価の測定方法は文献に詳細に記載されている。

更に、本発明の医薬組成物はアポリポタンパク質をコードする挿入遺伝子を含む1種以上の欠損組換えアデノウイルスも含んでいてもよい。これらの2種の遺伝子を組み合わせることにより、HDLの活性とコレステロールの逆輸送に相乗効果を発揮することができる。アポリポタンパク質をコードする挿入遺伝子を含むアデノウイルスの構築については国際公開第WO94／25073号に記載されている。好ましい組み合わせの1

例は、本発明によるアデノウイルスとアポリポタンパク質AⅠ又はアポリポタンパク質AⅡVをコードする遺伝子を含むアデノウイルスである。

本発明は特に心筋梗塞、アンギナ、突然死、心臓代償不全、脳血管発作、アテローム性動脈硬化症又は再発狭窄症等の心臓血管疾患の分野で、リポタンパク異常血症に関連する疾病の治療又は予防に非常に有効な新規手段を提供する。より広義には、本発明のアプローチは各症例でLCATの遺伝又は代謝不全を緩和できる非常に有望な治療手段を提供する。

更に、この治療はヒトだけでなく、ヒツジ、ウシ、家畜（イヌ、ネコ等）、ウマ、魚類等の全動物に適用できる。

以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、これらの実施例は非限定的な例示とみなすべきである。

図面の説明

図1：プラスミドpXL2639の模式図。

図2：プラスミドpXL2640の模式図。

図3：アデノAdCMV hLCA TによるHep3B細胞のトランスフェクション。Hep3B細胞にアデノAdCMVhLCA T（白四角）又はアデノAdCMV β gal（黒四

角）を感染多重度10、25、50、100、250及び500で感染させた。72時間後に上清中のLCA T活性を測定した。測定は2回行い、各値は平均土標準偏差を表す。

図4：感染又は非感染マウスの肝臓から単離したRNAのノーザンブロット分析。対照マウス（1）、アデノAdCMV β gal感染マウス（2）又はアデノAdCMV hLCA T感染マウス（3）の肝臓から完全RNAを採取した。RNA10 μ gをホルムアルデヒド-1、2%アガロース電気泳動により分離し、ナイロン膜に移してヒトLCA T及びマウスアポEの各プローブとハイブリダイズさせた。

図5A及び5B：ヒトLCA Tの遺伝子の導入が血漿中の総コレステロール濃度及びHDLコレステロール濃度に及ぼす効果。対照マウス（白四角）又はヒトアポリタンパク質A-Iを発現するトランスジェニックマウスに1 \times 10⁸ pfuのアデノAdCMV hLCA T（白丸）もしくは1 \times 10⁸ pfuのアデノAdCMV β gal（黒四角）を注射後の血漿中の総コレステロール濃度及びHDLコレステロール濃度（平均土標準偏差）。*：アデノAdCMV β galを感染させたマウスとの差P<0.0001。

図6：ヒトLCA Tの遺伝子の導入が血漿のヒトアポA-I濃度に及ぼす効果。

対照マウス（白四角）又はヒトアポリポタンパク質A-Iを発現するトランスジェニックマウスに 1×10^8 p f u のアデノAdCMV hLCAT（白丸）もしくは 1×10^8 p f u のアデノAdCMV β gal（黒四角）を注射後の血漿中のヒトアポA-I濃度（平均±標準偏差）。*：アデノAdCMV β galを感染させたマウスとの差 $P < 0.0001$ 。

図7：ヒトLCATの遺伝子の導入がコレステロールのリポタンパク質分布に及ぼす効果。 5×10^8 p f u のアデノAdCMV hLCAT（黒四角）もしくは 1×10^8 p f u のアデノAdCMV hLCAT（黒丸）の注射から5日後のマウス又は対照マウス（白四角）から血漿を採取した。血漿をゲル濾過クロマトグラフィーによりSuperose-6カラムで分離し、各溶出フラクション中のコレステロールを測定する。

図8：ヒトLCATの遺伝子の導入がHDL粒子の寸法に及ぼす効果。 1×10^8 p f u のアデノAdCMV hLCATの注射から5日後のマウス（実線）又は対照マウス（破線）から血漿を採取した。血漿をポリアクリルアミドゲル（勾配4→2

0%）上で分離し、ウェスタンブロットにより展開した後、ヒト抗アポA-I特異抗体によりヒトアポA-Iを検出する。その後、ブロットをデンストメーターによりスキャンする。

図9：ヒトLCATの遺伝子の導入がアポA-Iを含む粒子の移動度に及ぼす効果。 1×10^8 p f u のアデノAdCMV β gal（1）、 5×10^8 p f u のアデノAdCMV hLCAT（2）又は 1×10^8 p f u のアデノAdCMV hLCAT（3）の注射から5日後にマウスから血漿を採取した。血漿 2μ lを使用してアガロースゲル電気泳動によりHDLを分離した後、脂質をスーダンブラックで着色する。

図10：ヒトLCATの遺伝子の導入が血清のコレステロール流出促進能に及ぼす効果。 1×10^8 p f u のアデノAdCMV hLCAT（白丸）もしくは 1×10^8 p f u のアデノAdCMV β gal（黒四角）の注射から5日後のマウス又は対照マウス（白四角）から血漿を採取した。2.5%に希釈した血清を、

放射性コレステロールを予め添加しておいたF u S A h細胞と共にインキュベーション後に培地と細胞中の放射能を測定することによりコレステロール流出を計算する。*:対照マウスとの差 $P < 0.01$ 。*:対照マウス又はアデノAd CM

V β g a lを感染させたマウスとの差 $P < 0.0005$ 。

一般分子生物学技術

プラスミドDNAの分取抽出、プラスミドDNAの塩化セシウム勾配遠心分離、アガロース又はアクリルアミドゲル電気泳動、DNAフラグメントの電気溶離精製、タンパク質のフェノール又はフェノールクロロホルム抽出、塩類溶媒中のDNAのエタノール又はイソプロパノール沈降、大腸菌での形質転換等の分子生物学で慣用的に使用されている方法は当業者に周知であり、文献に詳細に記載されている[Maniatis T.ら, "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y., 1982; Ausubel F. M.ら(編), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987]。

pBR322、pUC型のプラスミド及びM13系ファージは市販品である(Bethesda Research Laboratories)。

連結については、DNAフラグメントをアガロース又はアクリルアミドゲル電気泳動によりその寸法に応じて分離し、フェノール又はフェノール/クロロホルム混合物で抽出し、エタノール沈降させた後、製造業者の指示に従ってファージT4 (Bio labs) のDNAリガーゼの存在下でインキュベートする。

付着5'末端の充填は製造業者の指示に従って大腸菌(Bio labs)のDNAポリメラーゼIのクレノーフラグメントにより実施できる。付着3'末端の破壊は、ファージT4 (Bio labs)のポリメラーゼDNAを製造業者の指示に従って使用することにより実施される。付着5'末端の破壊はヌクレアーゼ

S1処理により実施される。

合成オリゴヌクレオチドによるインビトロ突然変異誘発は、Amershamから市販されているキットを使用することにより、Taylorら [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749~8764] により開発された方法に従って実施することができる。

所謂PCR法 [Polymerase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R. K. ら, S

cience 230 (1985) 1350~1354; Mullis K. B. と Faloona F. A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335~350] によるDNAフラグメントの酵素増幅は、「DNAサーマルサイクラー」(Perkin Elmer Cetus)を製造業者の指示に従って使用することにより実施することができる。

ヌクレオチド配列の確認は、Amershamにより市販されているキットを使用することにより、Sangerら [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463~5467] により開発された方法により実施することができる。

実施例

実施例1：ヒトレシチン-コレステロールアシルトランスフェラーゼ (hLCAT) の遺伝子を含む欠損組換えアデノウイルスゲノムの構築：

上述のように、特に挿入したい遺伝子をもつプラスミドとアデノウイルスを適当な細胞系に同時トランスフェクション後に相同組換えさせて欠損組換えアデノウイルスを作製した。

A. ヒトLCATの遺伝子をもつプラスミドの作製：

1. プラスミドpXL2616の構築

プラスミドpXL2616はヒトレシチン-コレステロールアシルトランスフェラーゼをコードするcDNAを含む。

このプラスミドは次のように構築した。

He p G 2細胞の完全RNAからRT-PCR法によりLCATのcDNAに対応するDNAフラグメントを単離した(First-Strand cDNA合成キット、Pharmacia)。cDNAはヘキサヌクレオチドプローブを用いてポリアデニル化RNAの逆転写により作製した。次に、LCATの配列の5' Cla I部位と3' Sal I部位を付加することが可能なヒトLCATの配列の特異的オリゴヌクレオチドS q 5209: CCC TCG AGG CCA TCG ATG AGG CCT GAC TTT TTC AAT AAA (配列番号1) 及びS q 5287: GCG TCG ACA GCT CAG TCC CAG GCC TCA GAC GAG (配列番号2) (Mac L eanら, Proc. Natl. Acad. Sci., 83, 1986)を用いてこれらのcDNAでPCR反応を行った。得られた1750bpフラグ

メントをプラスミドpCR-III (TAクローニングキット、Invitrogen)にクローニングし、その配列を確認した。得られたプラスミドをpXL2616と命名した。

2. プラスミドpXL2639 (図1) 及びpXL2640 (図2) の構築

プラスミドpXL2639及びpXL2640は夫々CMVの初期プロモーターとRSVウイルスのLTRプロモーターの制御下にヒトLCATのcDNAを含む。

これらのプラスミドは、

一国際公開第WO94/25073号に記載されているプラスミドpXL2375 (CMVプロモーター) 及びpXL2376 (RSV-LTRプロモーター) をCla I及びSal Iで消化してアボA-IのcDNAを切り出し、次いで一予め消化しておいた上記プラスミドにヒトLCATのcDNAを含むプラスミドpXL2616のCla I-Sal Iフラグメントを挿入することにより構築した。

B. ヒトレシチン-コレステロールアシルトランスフェラーゼのインビトロ発現

こうして構築したベクター (pXL2639及びpXL26

40) を293細胞に一過性トランスフェクション後に酵素の発現と機能性を試験した。

Wilgerら, Cell, 11 (1977) 223の方法に従ってリン酸カルシウム-DNA複合体によりDNAを導入した。

トランスフェクションから60時間後に、ChenとAlbers, JLR, 23 (1982) 680の方法に従って細胞上清でLCAT活性を測定した。測定は、アポA-I、14Cコレステロール及びホスファチジルコリンを0.8:12.5:250のモル比で30分間37℃でインキュベートすることより調製したプロテオリポソームを外来基質として使用することにより実施した。活性は、基質を血漿又は培養上清4μlと共に37℃で2時間インキュベーション後に14Cコレステロールから14Cコレステロールエステルへの転化を測定することにより決定する。形成されたエステルを石油エーテル-ジエチルエーテル-酢酸の76:20:1混合物によりシリカプレート上で薄層クロマトグラフィー分離し、液体シンチレーションスペクトル分析により放射能を測定する。

得られた結果は、トランスフェクトした293細胞により分

泌されるヒトLCATが機能的であることを示す。

C. 組換えアデノウイルスの作製

次に、Aで作製したプラスミドを直鎖化し、アデノウイルスのE1領域(E1A及びE1B)によりコードされる機能をトランス付加するヘルパー細胞(293系)に同時トランスフェクトし、欠損アデノウイルスベクターとの組換えを行った。

アデノウイルスAd. CMVLCATは、酵素XmnIにより直鎖化したプラスミドpXL2639とClaIにより直鎖化したアデノウイルスAd. RSVβgalをリン酸カルシウムの存在下で293系に同時トランスフェクトして相同組換えさせるというプロトコールに従い、アデノウイルスAd. RSVβgal(Stratford-Perricaudetら, J. Clin. Invest. 90 (1992) 626)とプラスミドpXL2639の相同組換えにより得た。こうして生成した組換えアデノウイルスをプレート上で精製して選択す

る。単離後、組換えアデノウイルスを293細胞系で増幅し、約 10^{10} p f u / m l の力価をもつ非精製欠損組換えアデノウイルスを含む培養上清を得る。

公知技術(特にGrahamら、Virology 52(1

973)456参照)に従ってウイルス粒子を塩化セシウム勾配上で遠心分離により精製する。アデノウイルスAd、CMVLCATを20%グリセロール中で-80℃で保存する。

同一プロトコールをプラスミドpXL2640で繰り返し、組換えアデノウイルスAd、RSVLCATを得た。

実施例2：欠損組換えアデノウイルスに媒介されるヒトLCATの遺伝子のインビトロ発現

Hep3B細胞(ヒト肝細胞系)に組換えアデノウイルスAdCMV-hLCATを10、25、50、100、250及び500のMOIで感染させた後に酵素の発現及び機能性を試験した。組換えアデノウイルスAdCMV β galを対照として使用した。ChenとAlbers, JLR, 23(1982)680の方法に従い、感染から72時間後に細胞上清上でLCAT活性(培地100 μ l中に1時間に生産されるコレステロールエステルの総量)を測定した。結果(図3)は、培地に分泌されるヒトLCATが機能的であり、酵素の発現レベルが細胞中のウイルス濃度に依存することを示す。

実施例3：欠損組換えアデノウイルスに媒介されるヒトLCATの遺伝子のインビボ発現

ヒトアポA-IのトランスジェニックC57B1/6マウスの尾静脈に組換えアデノウイルスAdCMV-hLCAT(5×10^8 又は 1×10^9 p f u)、AdCMV- β gal(1×10^9 p f u)又は非ウイルス溶液を注射して感染させた。AdCMV-hLCATを感染させたマウスの血漿中には注射から5日後に非常に高レベルのLCAT活性($3266 \pm 292 \sim 9068 \pm 12$ nmol / m l / h)が検出されたが、非感染マウス又はAdCMV- β galを感染させたマウスで観察されたレベルはマウスの血漿の基礎LCAT活性に対応する

。

AdCMV-hLCATを感染させたマウスの肝臓のRNAでノーザンブロットを実施した処、ヒトLCATの完全cDNAに対応するプローブとハイブリダイズする単一種のメッセンジャーRNAの発現を検出することができたが、対照マウスの肝臓のRNAで実施したノーザンブロットではハイブリダイゼーションは全く検出されなかった（図4）。

実施例4：ヒトLCATの発現が血漿中のリポタンパク質及びアポリポタンパク質濃度に及ぼす効果

ヒトLCATの一過性発現は循環脂質及びヒトアポリポタンパク質A-I（hApoA-I）濃度の有意変化をもたらした。

表1に要約するように、感染から5日後に最大の変化が観察された。

1×10^8 pfuのAdCMV-hLCATを感染させたマウスの血漿中HDLコレステロール及び総コレステロール（TC）濃度は、対照マウスで観察された濃度の夫々7倍及び6倍であった（図5a及び5b）。これらの変化に加え、エステル化コレステロール（EC）及び遊離コレステロール（FC）は対照マウスで得られた濃度の夫々8倍及び2.5倍に増加している。血漿中EC濃度が増加すると、HDLフラクション中のCE/TC比が増加する。 1×10^8 pfuのAdCMV-hLCATを感染させたマウスのヒトApoA-I濃度は、対照マウスと比較して2.5倍の増加を示す（図6）。

表1. 対照及びアデウイルスを感染させたヒトアポA-Iトランスジェニックマウスの
血漿中の脂質及びアポリポタンパク質パラメーター

	対照マウス (n=5)	AdCMV β gal 感染マウス(n=5) 1×10^8 pfu/匹	AdCMV β gal 感染マウス(n=5) 5×10^8 pfu/匹	AdCMV LCAT 感染マウス(n=5) 1×10^8 pfu/匹
総コレステロール(TC)	132 \pm 14	139 \pm 18	462 \pm 116 ^c	827 \pm 49 ^a
コレステロールエステル (EC)	68 \pm 8	71 \pm 10	319 \pm 22 ^b	587 \pm 41 ^a
遊離コレステロール(FC)	63 \pm 11	68 \pm 9	143 \pm 37 ^c	239 \pm 62 ^b
E C / C T	0.52 \pm 0.06	0.5 \pm 0.07	0.69 \pm 0.04 ^c	0.71 \pm 0.04 ^c
(VLDL+LDL)-TC	15 \pm 3	20 \pm 6	33 \pm 12 ^d	30 \pm 3 ^{c, e}
トリグリセリド	49 \pm 3	50 \pm 7	90 \pm 5 ^c	140 \pm 7 ^b
リン脂質	313 \pm 40	309 \pm 20	773 \pm 53 ^c	954 \pm 65 ^b
ヒトアポA-I	247 \pm 14	246 \pm 30	542 \pm 32 ^c	616 \pm 17 ^a
LCAT活性(nmol/ml/h)	45 \pm 2	45 \pm 3	3266 \pm 292 ^a	9068 \pm 812 ^a
内因性エステル化速度 (nmol/ml/h)	49 \pm 11	161 \pm 17	ND	340 \pm 5 ^c
H D L - C T	117 \pm 12	119 \pm 14	429 \pm 127 ^c	797 \pm 48 ^a
H D L - E C	66 \pm 8	67 \pm 10	317 \pm 11 ^b	570 \pm 20 ^a
H D L - F C	51 \pm 11	52 \pm 12	112 \pm 28 ^c	227 \pm 53 ^b
H D L 中の E C / T C	0.56 \pm 0.05	0.57 \pm 0.05	0.74 \pm 0.03 ^c	0.72 \pm 0.03 ^c

全脂質及びリポタンパク質値は mg/dl として表す。* $p < 0.0001$ 、

^b $p < 0.0004$ 、^c $p < 0.01$ 、^d $p = \text{NS}$ (対照マウス及びアデノ AdCMV

β gal 感染マウスとの差)。^e $p = \text{NS}$ (アデノ AdCMV β gal 感染マウ

スとの差)。

実施例5: ヒトLCATの発現がリポタンパク質中のコレステロールの分配、H

DLの寸法及び電気泳動移動度に及ぼす効果

ゲル濾過分析クロマトグラフィーによりマウスの血漿プールからリポタンパク質フラクション中にコレステロールを分配させた(図7)。溶出フラクション中のTC及びヒトアポA-I濃度を測定した。これらの分析によると、 1×10^8 pfuのAdCMV-hLCATを感染させたマウスでは対照マウスに比較してHDLフラクション中のコレステロールの多量の蓄積とHDLの寸法の増加が検出される。ヒトアポA-IはHDLの寸法の粒子に結合していることが認められる。

ヒトアポA-IのトランスジェニックマウスにおけるアポA-Iを含むリポタ

ンパク質の寸法の分布はバイモーダルであり、9.4 nmと11 nmの寸法のピークがある。対照マウスではこの同一分布が保たれるが、AdCMV-hLCA Tを感染させたマウスでは分布が変化する。 1×10^8 p f uのAdCMV-hLCA Tを感染させたマウスでは、小さいほうのピークが消え、より大きい13.3及び14.2 nmの2つのピークが出現する(図8)。

血漿リボタンパク質を非変性アガロースゲルで電気泳動によ

り分離した後、脂質を検出した。図9に示すように、AdCMV-hLCA Tを感染させたマウスの血漿にはプレα移動度をもつHDLが検出され、HDLの寸法だけでなくHDLの表面電荷も変化していることが認められる。

要約すると、ヒトアポA-IのトランスジェニックマウスにおけるヒトLCA Tの強い一過性発現は、HDLコレステロール及びヒトアポA-I濃度の増加とHDLの寸法及び電荷の増加をもたらし、アテローム原性の低いリボタンパク質特徴を形成する。

実施例6：ヒトLCA Tの発現が細胞コレステロールの流出に及ぼす効果

Fu5AHラットの肝癌細胞を感染又は非感染マウスの血漿プールと共にインキュベーション後に細胞コレステロールの流出を測定した。図10は、AdCMV-hLCA Tを感染させたマウスの血漿ではAdCMV βgalを感染させたマウスの血漿と比較して65%の流出の増加が得られることを示す。この増加はAdCMV-hLCA Tを感染させたマウスにおける高濃度のヒトアポA-I及びHDLコレステロールに相関していることが明らかである。これらの結果はヒトLCA Tの

強い発現によりコレステロールの逆輸送の効果を高めるのに有利である。

配列表

配列番号：1

配列の長さ：39

配列の型：ヌクレオチド

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

ハイボセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

CCCTCGAGGC CATCGATGAG GCCTGACTTT TTCAATAAA 39

配列番号：2

配列の長さ：33

配列の型：ヌクレオチド

鎖の数：2本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

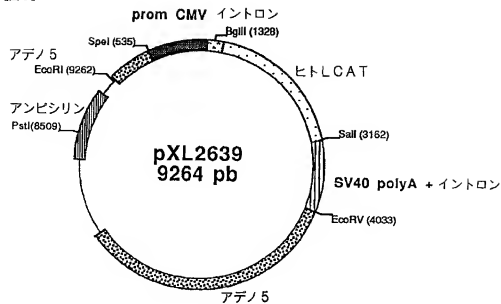
ハイボセティカル配列：No

アンチセンス：No

配列

GCCTCGACAG CTCAGTCCCA GGCCTCAGAC GAG 33

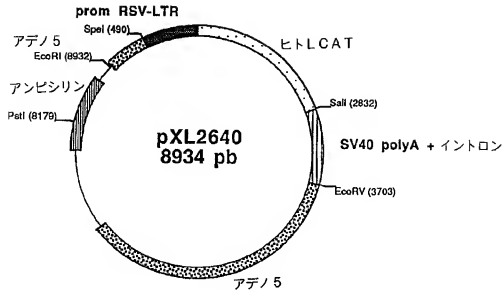
【図1】



pXL2639

Figure 1

【図2】



pXL2640

Figure 2

【図3】

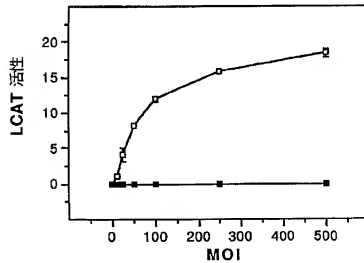


Figure 3

【図4】

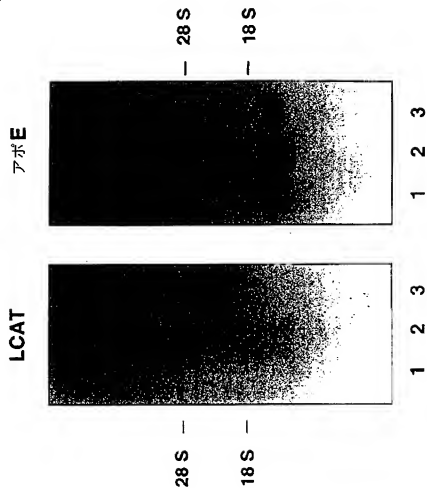


Figure 4

【図5】

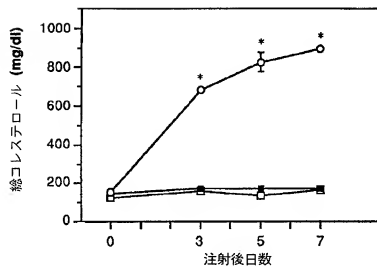


Figure 5a

【図5】

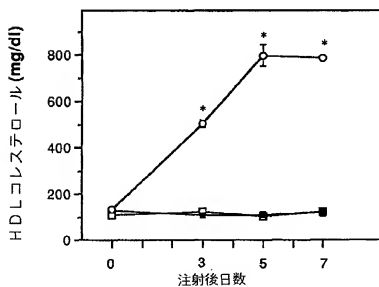


Figure 5b

【図6】

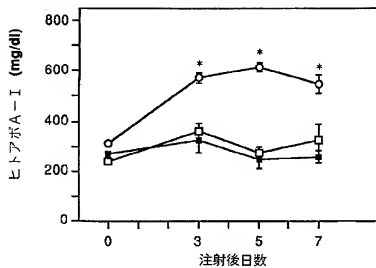


Figure 6

【図7】

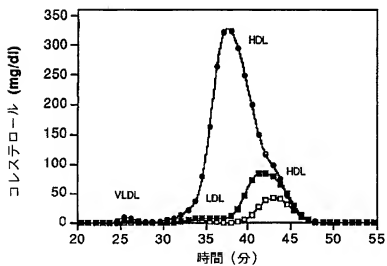


Figure 7

【図8】

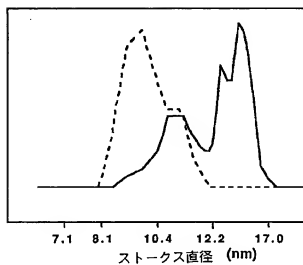


Figure 8

【図9】

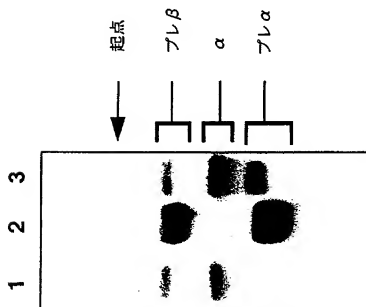


Figure 9

【図10】

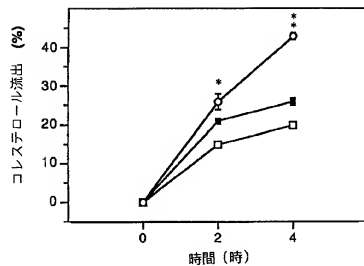


Figure 10

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		Inter. Appl. No.
IPC 6 C12N15/54 C12N5/10 C12N15/86 A61K38/45 A61K39/235 C12N7/01 //C12N15/12, C07K14/775		PC1/FR 96/00381
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 6 C12N C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevance to claim No.
Y	EP,A,0 222 591 (GENENTECH INC) 20 May 1987 see page 2, line 30 - line 54 see page 3, line 25 - line 65 see page 7, line 30 - line 50 see page 8, line 30 - line 48 see examples	1-20
Y	WO,A,95 02697 (RHONE-POULENC RORER SA ;PERRICAUDET MICHEL (FR); VIGNE EMMANUELLE) 26 January 1995 cited in the application see page 3, line 9 - page 6, line 24 see page 11, line 3 - line 8 see examples see claims	1,12, 16-20
		--- -/-
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, each combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"Z" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search		Date of making of the international search report
19 July 1996		29.07.95
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentplatz 2 NL - 2200 SB Rijswijk Tel. (+ 31-70) 240-2040, Tlx. 31 451 epo nl, Fax: (+ 31-70) 240-3594		Authorized officer Andres, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Enter oral Application No.
PC1/FR 95/00381

C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Reference to claim No.
Y	WO,A,93 09239 (RES CORP TECHNOLOGIES INC) 13 May 1993 cited in the application see page 5, line 10 - line 24 see page 9, line 19 - page 11, line 13 see claims ---	13,14
Y	EP,A,0 178 220 (PASTEUR INSTITUT ;CENTRE NAT RECH SCIENT (FR)) 16 April 1986 cited in the application see claims ---	15
A	WO,A,94 28152 (TRANSGENE SA ;IMLER JEAN LUC (FR); METHALI MAJID (FR); PAVIRANI AN) 8 December 1994 cited in the application see page 5, line 24 - page 9 see examples 2,4,5 see claims ---	1-4,11, 12,20
A	WO,A,94 26914 (RHONE POULENC RORER SA ;HADDADA HEDI (FR); KLONJKOWSKI BERNARD (FR)) 24 November 1994 cited in the application see page 2, line 9 - page 7, line 31 see claims see figure 2 ---	1-3,11, 20
A	JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, vol. 18a, 4 - 23 January 1994, page 222 XP062068902 BEROIT, P. ET AL.: "Evaluation of recombinant adenovirus vectors for gene therapy of lipoprotein disorders" see abstract ---	20
A	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 20, no. 9, 11 May 1992, OXFORD G8, pages 2233-2239, XP062008903 WILKINSON, G. & AKRIGG, A.: "Constitutive and enhanced expression from the CMV major IE promoter in a defective adenovirus vector" ---	
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 83, WASHINGTON US, pages 2335-2339, XP062006904 MCLEAN, J. ET AL.: "Cloning and expression of human lecithin-cholesterol acyltransferase cDNA" cited in the application -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Patent and Application No.

PC1/FR 96/00381

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0222591	20-05-87	US-A- 5049488 DE-A- 3687948 JP-A- 62111682	17-09-91 15-04-93 22-05-87
WO-A-9502697	26-01-95	FR-A- 2707664 FR-A- 2718749 AU-B- 7264694 CA-A- 2144040 CN-A- 1113390 CZ-A- 9500639 EP-A- 0667912 FI-A- 951138 HU-A- 72558 JP-T- 8501703 NO-A- 950939 NZ-A- 269156 PL-A- 368122 ZA-A- 9405012	20-01-95 20-10-95 13-02-95 26-01-95 13-12-95 15-11-95 23-08-95 13-04-95 28-05-96 27-02-96 10-03-95 26-03-96 24-07-95 20-02-95
WO-A-9309239	13-05-93	US-A- 5252479 AU-B- 657829 AU-B- 3134093 CA-A- 2098483 EP-A- 0566732 JP-T- 6504680 PT-A- 101040	12-10-93 23-03-95 07-06-93 09-05-93 27-10-93 02-06-94 31-05-94
EP-A-0178220	16-04-86	DE-A- 3585072	13-02-92
WO-A-9428152	08-12-94	FR-A- 2705686 AU-B- 6850394 CA-A- 2141212 EP-A- 0652968 JP-T- 7509616	02-12-94 20-12-94 08-12-94 17-05-95 26-10-95
WO-A-9426914	24-11-94	FR-A- 2705361 AU-B- 6787894 BR-A- 9406720 CA-A- 2163256 CZ-A- 9503028	25-11-94 12-12-94 06-02-96 24-11-94 14-02-96

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

for Serial Application No

PCT/FR 96/00381

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9426914		EP-A- 0698108	28-02-96
		FI-A- 955552	27-12-95
		NO-A- 954466	07-11-95
		PL-A- 311660	04-03-96
		ZA-A- 9403358	15-01-95

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AU, BB, BG, BR, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, IS, JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ, VN

(72)発明者 ラターマイユ, マルティエヌ
フランス国、エフー94220・シヤラントン
ールーボン、リュ・ドウ・バリ、141

(72)発明者 セギユレ, サンドリヌ
フランス国、エフー78180・モンティニー
ールーブルトヌー、リュ・シヤルルーリ
ネ、13